

*Сазонов С.В.*

## **МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ СТАРЕНИИ**

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург,  
Российская Федерация

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский  
университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Регуляция клеточной пролиферации в органах осуществляется с помощью сложной иерархической системы, в которой выделяют внутриклеточный, межклеточный, внутритканевой, межтканевой и организменные уровни [1]. На уровне целого организма эти процессы находятся под контролем основных его регулирующих систем: гуморальной, нервной и иммунной. До сих пор определенная роль в регуляции клеточного деления в органах и тканях отводится нервной и эндокринной системам, представляющих из себя системы регуляции функций, из которых как следствие вытекает и формообразующая регуляция, не сводимая к функциональной. В тоже время, показано, что денервация органов или изменение уровней содержания гормонов как в центральных, так и периферических эндокринных органах не отменяют развитие регенераторных процессов в тканях, а оказывают влияние только на темпы и масштабы их проявления через изменение активности метаболических процессов в клетках. Являясь важнейшей и филогенетически более древней функциональной частью иммунной системы, чем та, которая обеспечивает развитие гуморального иммунитета и образование антител, морфогенетическая функция лимфоцитов осуществляет регуляцию пролиферативных процессов в организме [2-6]. В норме лимфоидная регуляция означает своевременную стимуляцию и торможение пролиферации клеток любой ткани, обеспечивая таким образом постоянство клеточной численности и анатомической целостности всех органов и тканей в процессе физиологической и репаративной регенерации. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток обеспечивается путем реализации двухстадийной (двухфазной) программы регуляции пролиферации и дифференцировки клеток их тканей-мишеней, являясь при этом постоянной составляющей также и иммунных реакций и обеспечивая пролиферацию иммунокомпетентных клеток как при гуморальном, так и при клеточном иммунитете. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток имеет ряд особенностей и закономерностей своего действия. В частности, морфогенетической функции

лимфоидных клеток свойственна преимущественная органоспецифичность. Это означает, что при адоптивном переносе лимфоидных клеток они в организме реципиента обязательно влияют на пролиферацию клеток органа, гомологичного органу донора, подвергнутому тому или иному повреждающему воздействию (например, оперативному вмешательству) или любому другому воздействию, активирующему Т-клеточное звено иммунной системы [2, 4]. При этом следует отметить, что реакция пролиферативной активности лимфоидных клеток реципиента всегда развивается в направлении, соответствующем перенесенному сигналу. В действии активированных регенерационным процессом лимфоидных клеток так же отмечается двухфазность. Сначала действуют лимфоциты, обладающие свойством стимулировать пролиферацию клеток органа-мишени, а затем, на высоте пролиферации, появляются лимфоциты, обладающие свойством тормозить клеточное деление в указанном органе. Эти лимфоциты не препятствуют завершению митотического цикла в клетках, вступивших в него, но препятствуют вступлению в цикл деления новых клеток. Тем самым они способствуют завершению пролиферативной волны и останавливают восстановительный процесс, предотвращая гиперрегенерацию. Таким образом, лимфоциты обеспечивают и начало, и завершение регенерационного процесса [2]. Функцию стимуляции и функцию ингибирования, осуществляют разные популяции Т-лимфоцитов со свойствами Т-хелперов или Т-супрессоров [7]. Активированные лимфоциты со стимулирующими способностями индуцируют у реципиента модус ускоренной пролиферации, характерной для регенерационных процессов, однако нужно учитывать, что все описанные процессы можно отследить лишь в сингенной системе.

Эксперименты, проведенные на мышах линии MRL, лишенных Т-клеток (исследования проведены в лаборатории проф. Ellen Heber-Katz) показали практически неограниченные регенераторные способности у этой линии мышей на фоне их более быстрого старения. На фоне увеличения числа Т-лимфоцитов в крови молодых MRL-мышей с возрастом они теряют способность к полноценной регенерации и наоборот, блокируя Т-клетки в крови взрослых мышей иных линий можно добиться стимуляции регенераторных процессов.

В настоящее время установлено, что старение организма протекает на всех уровнях его организации, в том числе и на клеточном. После прохождения клетками митотического цикла, периодов роста, дифференцировки и осуществления ими специфических функций жизненный цикл заканчивается их старением, за которым, в конечном счете, наступает разрушение и гибель [8]. При этом процессы, определяющие старение, неразрывно связаны с противоположно направленным процессом – восстановлением утраченных и поврежденных структур, или клеточной регенерацией. Единство этих двух явлений, по-видимому, и определяет исход жизненного цикла клетки,

а также интерес исследователей к клеточному уровню развития возрастных изменений регенераторных процессов в организме. Степень и форма проявления восстановительной способности различных внутренних органов млекопитающих очень вариабельны, что обусловлено различиями в морфо-функциональных особенностях развивающихся органов, которые и определяют исход восстановительных процессов. Проведенные под руководством член.-корр. РАН проф. А.П. Ястребова исследования позволили определить особенности состояния пролиферативных процессов в тканях различных органов при возрастной инволюции организма [1, 8]. Так было установлено, что активность процессов клеточного деления при старении организма снижается в лимфоидной ткани тимуса, лимфатических узлов, селезенки, миелоидной ткани костного мозга, эпителии тонкой кишки. Все перечисленные ткани относятся к одной группе — с высокой скоростью клеточного обновления и используют на клеточном уровне один основной способ регенерации — митотическое деление. При возрастной инволюции во всех органах обнаружено снижение активности пролиферативных процессов, что связано с уменьшением величины пролиферативного пула и митотической активности клеток за счет замедления их выхода в митотический цикл [9-12]. При изучении особенностей состояния пролиферативных процессов в органах с низкой скоростью клеточного обновления (печень, легкие, почки, щитовидная железа) были обнаружены другие изменения в состоянии пролиферативных процессов. В первую очередь в этих органах, при использовании метода проточной ДНК-цитометрии, не обнаружено достоверного снижения числа ДНК-синтезирующих клеток в тканях органов старых животных. В тоже время, одновременно в органах увеличивается доля полиплоидных клеток, происходит накопление клеток в премитотическом периоде цикла, за счет чего увеличивается и пролиферативный клеточный пул. Анализ полученных результатов позволяет говорить о связи процессов синтеза ДНК в тканях старых животных не с клеточным делением, так как не обнаруживается соответствующий уровень митотической активности, а с процессами эндомитоза, что сопровождается не делением клеток, а их полиплоидизацией [9]. Таким образом, если в тканях органов с быстрым клеточным обновлением при старении организма основным механизмом инволюции является подавление активности пролиферативных процессов за счет торможения вступления клеток в митотический цикл и снижения числа клеток-предшественников, то в органах с медленным клеточным обновлением на фоне торможения процессов клеточного деления происходит стимуляция эндомитоза, что сопровождается развитием полиплоидизации клеток [11,12].

В экспериментах, проведенных проф. А.Г. Бабаевой в условиях относительного дефицита лимфоидной ткани (тимэктомия, спленэктомия, общее облучение, введение животным антилимфоцитарных сывороток), отмечается угнетение восстановительных процессов. Однако при трансплантации

этим животным лимфоидных клеток степень угнетения пролиферации снижается [3, 13]. В экспериментах с адоптивным переносом лимфоидных клеток выявлена способность Т-популяции живых лимфоцитов оперированных животных стимулировать процессы пролиферации в тканях одноименных органов доноров. Показано, что такими свойствами обладают в основном Т-лимфоциты селезенки, тогда как тимоциты, Т-лимфоциты костного мозга и лимфатических узлов не способны переносить «пролиферативный стимул». Экспериментальные данные показывают, что первые часы после индукции регенераторных процессов протекают на фоне признаков усиления функции Т-хелперов, а подавление или снижение числа Т-супрессоров приводит к вспышке пролиферативной активности. Вместе с тем, лимфоциты неоперированных доноров не вызывают достоверного усиления пролиферации в модели адоптивного переноса [3, 7, 13]. В нашей лаборатории ранее было показано, что морфогенетическая функция лимфоцитов проявляется не только при регенерации миелоидной, костной тканей, печени, почек, кишечника, кожи, но эти клетки могут приобретать способность к стимуляции пролиферации эритроидного ростка при действии гипоксии на организм [1, 14-20]. В тоже время получены данные, показывающие, что в результате старения организма в нем снижается как общее число Т-лимфоцитов, так и клеток, относящихся к популяции Т-хелперов [21, 22], а также значительно изменяются их свойства [23, 24]. В этой связи интерес представляет изучение изменений морфогенетических свойств этих лимфоцитов у животных в процессе их старения.

В проведенных экспериментах использована модель адоптивного переноса лимфоидных клеток селезенки нефрэктомизированных животных из разных возрастных групп [25]. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар зрелого (8-10 месяцев, массой 200-250 г) и старого (19-22 месяца, массой 400-500 г) возраста. Животные содержались в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе питания. Животных выводили из опыта путем передозировки паров эфира в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных». Группы животных формировались следующим образом: контрольная группа — модель адоптивного переноса спленоцитов от зрелых животных зрелым; вторая — опытная группа: модель адаптивного переноса лимфоидных клеток от старых — старым животным; третья группа — трансплантация лимфоидных клеток от старых животных — зрелым; четвертая группа — трансплантация лимфоидных клеток от зрелых животных — старым.

Учитывая, что эпителиальная ткань почечных канальцев относится в группу тканей с низким уровнем пролиферативной активности, состояние пролиферативных процессов оценивали с помощью изучения статмокинетического индекса (позволяющего накапливать митозы за определен-

ный период времени) и иммуногистохимическим определением регуляторного белка пролиферации Ki67 (выявляется в ядрах клеток в G1, S и G2 периодах митотического цикла). Морфогенетические свойства клеток селезенки нефрэктомизированных животных из разных возрастных групп исследовались через 19 ч. после выполнения односторонней нефрэктомии (донорский интервал). Животных забивали, из селезенки готовили взвесь клеток в среде 199. Все манипуляции по приготовлению суспензии проводили на холоде. Полученная суспензия вводилась внутривенно реципиентам по  $400 \times 10^3$  клеток на 0,2 кг массы животного. За 8 часов до забоя животные получали внутрибрюшинно однократно в дозе 2 мг/кг массы винбластин. Реципиентов забивали через 40, 48 и 56 ч после переноса спленоцитов. Почки фиксировались в формалине, на гистологических срезах производили расчет статмокинетического индекса (СКИ), значения которого выражали в %. Для проведения иммуногистохимических исследований (ИГХ) материал фиксировали в 10% нейтральном формалине не более 24 часов, затем подвергали стандартной гистологической обработке [26]. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в миниавтоклаве Pascal (DakoCytomation), условия: 10 мин. при 15 psi (121°C) в Target Retrieval Solution (Dako, S1699). На депарафинизированных срезах с использованием автоматической системы Universal Staining System Autostainer Dako (Дания) проводили реакции с использованием системы визуализации EnVision+ Dual Link System – HRP (Dako, K4061), антигенреактивные клетки контрастировали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе — DAB). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию их ядер. Оценку ИГХ реакции Ki-67 определяли по процентному отношению числа окрашенных ядер клеток ко всей клеточной популяции и выражали в % [27, 28].

### Результаты и их обсуждение

При трансплантации лимфоидных клеток в контрольной группе (зрелые реципиенты и доноры) пик подъема статмокинетического индекса приходится на 48 часов после трансплантации спленоцитов доноров реципиентам (Таблица). В это время СКИ увеличивается в 26,8 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с предыдущим сроком. В эпителии канальцев обнаруживаются многочисленные митозы, увеличивается число клеток, ядра которых экспрессируют Ki67 (рис.1). Через 56 часов процессы клеточного деления в почке реципиентов ослабевают, а к 72 часам уже не отличаются от уровня в почках интактных животных соответствующего возраста.

При трансплантации спленоцитов старых животных после проведения им односторонней нефрэктомии старым реципиентам, у последних, во все изученные сроки, не обнаружено достоверного изменения уровня митотической активности в эпителии почечных канальцев (рис. 2).

Таблица  
 Статмокинетический индекс в эпителии канальцев почки  
 у реципиентов лимфоидных клеток от доноров  
 с односторонней нефрэктомией,  $M \pm m$ , %,   
 где  $M$  — среднее арифметическое,  $m$  — ошибка среднего

Модель адоптивного переноса	Продолжительность реципиентского интервала, ч.		
	40	48	56
Первая группа (контрольная)	$0,4 \pm 0,03$	$10,7 \pm 1,64$	$1,0 \pm 0,33$
Вторая группа (старые-старые)	$0,3 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,28$	$0,6 \pm 0,30$
Третья группа (старые-зрелые)	$0,3 \pm 0,07$	$14,2 \pm 1,21$	$4,8 \pm 0,62$
Четвертая группа (зрелые-старые)	$0,4 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,51$	$2,2 \pm 0,45$

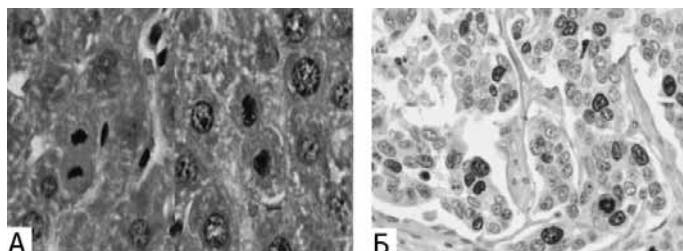


Рис. 1. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс контрольной группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — Высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1200. Б. — Иммуногистохимическое исследование Ki67. Ув. 600.

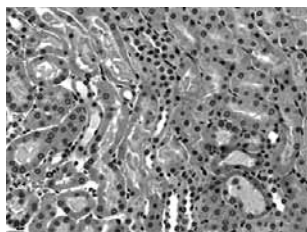


Рис. 2. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс второй группы. Реципиентский интервал 48 часов. Низкий уровень митотической активности, значений статмокинетического индекса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

Трансплантация этих же спленоцитов зрелым животным сопровождается увеличением статмокинетического индекса и уровня экспрессии Ki67 (Таблица, рис. 3) в почечных канальцах в 47,3 раза ( $p < 0,001$ ) с последующим

снижением его уровня к 56 ч. Однако и в этот срок уровень активности процессов клеточного деления в 4,8 раза превышает ( $p < 0,001$ ) уровень соответствующего показателя в почках контрольной группы.

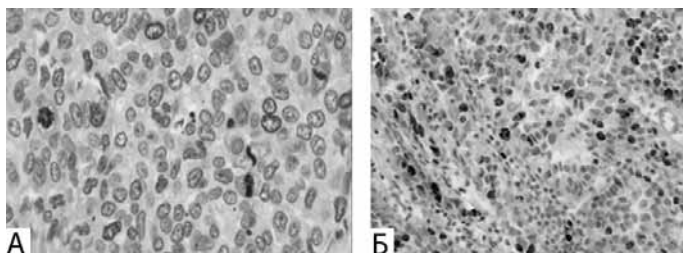


Рис.3. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс третьей группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 900. Б. — увеличение числа клеток, экспрессирующих Ki67. Иммуногистохимическое исследование. Ув. 200.

Адоптивный перенос лимфоидных клеток от зрелых животных к старым также приводит к подъему (в 7 раз;  $p < 0,001$ ) уровня статмокинетического индекса через 48 ч после их трансплантации (Таблица). Активность клеточного деления сохраняется примерно на этом же уровне и через 56 ч, что в 2,2 раза выше ( $p < 0,05$ ) уровня статмокинетического индекса при трансплантации спленоцитов от зрелых зрелым животным, в 3,7 раза ( $p < 0,01$ ) — при трансплантации от старых старым и в 2,2 раза ниже ( $p < 0,05$ ) — при выполнении адоптивного переноса этих же лимфоидных клеток зрелым животным.

Таким образом, использование системы адоптивного переноса позволило выявить особенности проявления морфогенетических свойств лимфоцитов у животных их разных возрастных групп. При трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров старым реципиентам не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Подобные изменения в системе адоптивного переноса могут происходить как за счет изменения морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так и за счет изменения пролиферативных потенций клеток почечного эпителия или за счет наличия обеих причин одновременно. Перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше, чем в контрольной группе. Трансплантация спленоцитов от зрелых доноров старым реципиентам также приводит к проявлению морфогенетических свойств лимфоидных клеток. Однако уровень активности пролиферативных процессов в почках реципиентов оказался значительно ниже, чем в контрольной группе.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать основ-



ной вывод — при старении организма снижение уровня пролиферативных процессов на связано с ослаблением морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так как последние в полной мере проявляются в организме молодых животных, хотя значительно снижены у старых. При старении в организме снижаются пролиферативные потенции почечной ткани, что проявляется в торможении реализации морфогенетических свойств лимфоцитов зрелых животных непосредственно в паренхиме органа у старых животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ястребов А.П. Некоторые итоги и перспективы изучения механизмов регенерации тканей при воздействии на организм экстремальных факторов/ Очерки экспериментальной патофизиологии.- Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». - 1999. - С.13-26.
2. Бабаева А.Г. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений / А.Г. Бабаева, Е.А. Зотикова. – М.: Наука, 1987. – 207 с.
3. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 1999. – Том128, №11. – С.484 – 490.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты – регуляторы активности пролиферации клеток в ткани. Вестник Уральской медицинской академической науки, Екатеринбург, 2007, №1 (15), С. 14-20.
5. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Возможности трансплантации лимфоцитов для восстановления регенерации в органах при старении организма. Госпитальный вестник, Екатеринбург, 2006, №4, с.24-29.
6. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Осипенко А.В., Макеев О.Г., Мещанинов В.Н., Сазонов С.В., Вечкаева И.В., Сырнев В.А. Об участии стволовых клеток в регуляции регенераторных процессов при экстремальных повреждениях. Сборник научных работ «Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2015, с. 108-113.
7. Бляхер М.С., Гуторова Н.М., Федорова И.М. и др. Численность субпопуляций лимфоцитов в селезенке и уровень пролиферации кроветворной ткани у мышей при оперативных вмешательствах//Микробиология и иммунология – 1996. – №3. – С.301 – 303.
8. Сазонов С.В. Возрастные особенности состояния регенераторных процессов в тканях/ Очерки экспериментальной патофизиологии.- Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». - 1999. - С.352-365.
9. Сазонов С.В. Анализ пролиферативных процессов в органах с разными механизмами клеточного обновления при старении организма. Морфология, 2016, 149 (3), С.177.
10. Сазонов С.В. Состояние митотического цикла в клетках почечного эпителия после односторонней нефрэктомии. Сборник научных трудов УИИ



Всероссийской конференции по патологии клетки, 11-12 ноября 2010, Москва, С.210-212.

11. Сазонов С.В. Особенности пролиферативных процессов в тканях с высокой скоростью клеточного обновления при возрастной инволюции организма. Морфология, 2012, Т.141, №3, С.136.

12. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Ястребов А.П. Возрастные особенности временных параметров клеточного цикла в эпителиальных клетках паренхиматозных органов у крыс. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием: «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва, 6-7 апреля 2016 г. С. 157-158.

13. Babaeva A.G. Recent trends in regeneration research// Life Sci. - N.Y.-Lond., 1989. – Vol.172. -P.121-128.

14. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Влияние лимфоцитов на пролиферацию почечного эпителия при гипотермии. Госпитальный вестник, Екатеринбург, 2006, №4, С.32-38.

15. Сазонов С.В., Шамшурина Е.О., Береснева О.Ю., Курумчина С.Г., Валамина И.Е. Изменение морфогенетических свойств трансплантированных Т-лимфоцитов при старении организма. Материалы III Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

16. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Морфогенетическая активность трансплантированных лимфоидных клеток при гипотермии. Материалы III Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

17. Сазонов С.В. Морфогенетические свойства лимфоидных клеток при возрастной инволюции организма. Аллергология и иммунология, 2008, Том 9, №3.

18. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Состояние клеточной регенерации после односторонней нефрэктомии при действии холода на организм. Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина», Москва, 2011, 14.10.2011, С.136-137.

19. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Сравнительный анализ регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая

инженерия, 2012, Т.УП, №2, С. 22-23.

20. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Влияние трансплантированных Т-лимфоцитов на состояние регенераторных процессов в органах при старении организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Т.УП, №2, С. 46.

21. Flaherty D., Wagner C., Gross C. Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat// Immunopharmacol. -1997.- Vol.2. – P.185-195.

22. Haynes L., Linton P.J., Swain S.L. Age-related changes in CD4 T cell of T cell receptor transgenic mice// Mech. Ageing Dev.- 1997.- Vol.93 (1-3). P.95-105.

23. Proust J.J., Quadri R.A., Arbogast A., Phelouzat M. Mecanismes moleculaires du dysfonctionnement lymphocytaire lie a l'age// Pathol.Biol.Paris, 1996. – Vol.44(8). – P. 729-236.

24. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. Trends Immunol. 2016. May; 27 (5) – p. 235-43.

25. Сазонов С.В., Конышев К.В. Использование адоптивного переноса лимфоидных клеток для стимуляции пролиферативных процессов при возрастной инволюции организма. Цитология, 2011, Т. 53, №9. С.735-736.

26. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Конышев К.В. Стандартизация иммуногистохимического определения уровня экспрессии Ki-67 в клетках различных тканей. Морфология, 2017, Т.151, №3, С. 100.

27. Сазонов С.В. Определение уровня пролиферации в тканях органов при иммуногистохимическом исследовании Ki-67. Морфология, 2018, Т.153, №3, С. 242.

28. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Состояние процессов пролиферации в почечном эпителии после односторонней нефрэктомии. Морфология, 2010, Том 137, №4, С.167.